

Тараканова Оксана Ивановна

**РОЛЬ ХОЛЕСТЕРИНА МЕМБРАНЫ В СЕКРЕЦИИ НЕЙРОМЕДИАТОРА И
ЭКЗОЦИТОЗЕ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ ИЗ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ
ОКОНЧАНИЙ**

03.03.01 - физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань-2011

Работа выполнена в ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,
член-корр. РАМН, Заслуженный деятель науки РФ,
Зефилов Андрей Львович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
Волков Евгений Михайлович
доктор медицинских наук, профессор
Исакова Лариса Сергеевна

Ведущая организация – ГОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита состоится «__» _____ 20____ г. в «__» часов на заседании Диссертационного совета Д 212.078.02 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Федерального агентства по образованию и науке РФ по адресу: 420008, г. Казань, ул. Левобулачная, д. 44

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» (420012, Казань, ул. Бутлерова, 49, корпус Б).

Автореферат разослан «__» _____ 2011 г

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.м.н., профессор



Зефилов Т.Л.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Секреция нейромедиатора в химическом синапсе происходит в результате экзоцитоза — слияния мембраны синаптической везикулы (СВ) с пресинаптической мембраной, в результате которого порции (кванты) медиатора секретируется в синаптическую щель [Sudhof T. C., 2004]. Затем с помощью клатрин-опосредованного эндоцитоза происходит повторный захват мембранного фрагмента слившейся везикулы внутрь нервного окончания (НО) — образование новой везикулы, которая после заполнения нейромедиатором может повторно участвовать в секреции медиатора. Процессы экзо- и эндоцитоза СВ составляют везикулярный цикл, который за счет рециклирования СВ обеспечивает сохранение высокого уровня секреции медиатора при высокочастотной активности синапса (Betz W.J., et. all, 2005; Зефиров А.Л., 2007; Levitan E.S., et all, 2010).

Исторически так сложилось, что белкам вовлеченным в процессы экзо- и эндоцитоза СВ уделялась львиная доля внимания; но в последнее время, благодаря развитию новых методов исследования, стало совершенно ясно, что липиды мембран также вносят существенный вклад во взаимодействие процессов экзо- и эндоцитоза СВ. (Rohrbough J., et all, 2005, Зефиров А.Л., и др. 2010).

Так, стало известно, о существовании на поверхности мембран, так называемых «липидных плотиков», маленьких (10-200нм), динамичных, гетерогенных доменов с высокой концентрацией холестерина и сфинголипидов, предназначенных для компартментализации клеточных процессов (Pike L.J., 2006). Показано, что холестерин модулирует многие клеточные функции, изменяет активность ряда белков, например Na/K-АТФазы, аденилатциклазы, метаболитных рецепторов, Ca^{2+} -каналов, NO-синтазы, NADH-оксидазы и т. д. (Pfrieger F. W., 2003; Taverna E., et all, 2004; Weixing H., et all, 2008). Недавно липидные плотики были обнаружены в пресинаптических мембранах двигательных нервных окончаний лягушки и мыши в областях, где протекают экзо-и эндоцитоз СВ (Петров А.М., и др. 2011).

Особый интерес вызывает холестерин, один из главных липидных компонентов клеточной мембраны, присутствие которого во многом регулирует текучесть мембраны (Sevc G., et. all, 1999). Присутствие холестерина необходимо для поддержания свойственной синапсу структуры и функционирования мозга (Herring D., et all, 2003; Pfrieger F.W., 2003; Salaun C., et all, 2004; Rohrbough J., et all, 2005). Показано, что во время развития мозга, холестерин, вырабатываемый глией, усиливает процесс синаптогенеза (Mauch D.H., et all, 2001; Pfrieger F.W., 2003; Goritz C., et all, 2005).

Удаление холестерина в хромаффинных клетках разрушает кластеры синтаксина, и тем самым уменьшает секрецию катехоламинов (Chamberlain L.H., et al. 2001; Lang T., et al., 2001; Gil. C., et al. 2005; Salaun C., et al. 2005). Возможно, обогащенные холестерином «липидные плотники» выполняют функцию платформ для локализации и активации белков SNARE комплекса, участвующих в слиянии мембран. Экстракция значительного количества холестерина приводит к «рассеиванию» плотников и белков SNARE комплекса в модельных мембранах, что нарушает процессы экзоцитоза (Gil C., et al., 2005; Taverna E., et al., 2004, 2007). Исследования на мушке *Drosophila* показали, что в результате мутации в гене церамидазы SLAB, приводящей к перераспределению холестерина в НО, происходит уменьшение примерно на 70 % способности СВ к слиянию (Rohrbough J., et al., 2004). Велико содержание холестерина и в мембранах СВ (Deutsch E., et al., 1981), где он взаимодействует с несколькими везикулярными белками (синаптобревин, синаптофизин) (Thiele C., et al., 2000). Существует предположение о холестерине как об пространственном организаторе рециклирования СВ (Jia J.Y., et al., 2006).

Цель и задачи исследования:

Целью данного исследования явилось изучение роли холестерина плазматической мембраны в процессах секреции медиатора и экзоцитоза СВ из двигательных нервных окончаний лягушки и мыши.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие задачи:

1. Оценить изменения содержания холестерина в мембранах нервно-мышечных препаратов лягушки и мыши, обработанных различными концентрациями метил- β -циклодекстрина (МЦД).
2. Исследовать эффекты различных концентраций МЦД на параметры спонтанной секреции медиатора в нервно-мышечных синапсах.
3. Изучить влияние ферментативного окисления холестерина мембраны на параметры спонтанной секреции медиатора в нервно-мышечных синапсах лягушки и мыши.
4. Проанализировать эффекты МЦД на вызванную секрецию медиатора и электрогенез нервного окончания при редком и высокочастотном раздражении в условиях пониженной внеклеточной концентрации ионов кальция.
5. Исследовать влияние ферментативного окисления мембранного холестерина на вызванную секрецию медиатора и электрогенез нервного окончания в ответ на одиночные раздражения в условиях пониженной внеклеточной концентрации ионов кальция.

6. Исследовать влияние МЦД на динамику секреции медиатора при высокочастотном раздражении в условиях высокой (нормальной) внеклеточной концентрации ионов кальция.
7. Изучить динамику экзоцитоза СВ при помощи флуоресцентного метода на фоне действия МЦД.

Положения, выносимые на защиту:

1. Удаление более 50% холестерина из плазматической мембраны при действии больших доз МЦД (10мМ), приводит к кальций - независимому увеличению спонтанной секреции медиатора.
2. Небольшое (10-20%) удаление холестерина из плазматических мембран с помощью малых концентраций МЦД (1 мМ) приводит к угнетению вызванной секреции медиатора за счет нарушения экзоцитоза СВ, увеличению времени синаптической задержки, уменьшению выраженности облегчения при низких внеклеточных концентрациях ионов Ca^{2+} и усилению выраженности депрессии при высоких внеклеточных концентрациях Ca^{2+} при высокочастотном раздражении.
3. Ферментативное окисление холестерина мембран, не влияя на спонтанную секрецию медиатора и время синаптической задержки, угнетает вызванное освобождение медиатора.
4. Холестерин плазматической мембраны участвует в процессах экзоцитоза СВ и секреции медиатора из двигательных НО, контролируя баланс между вызванной и спонтанной секрецией медиатора.

Научная новизна

Впервые показана важность холестерина в контроле соотношения спонтанной и вызванной секреции медиатора в двигательных НО лягушки и мыши. Обнаружено, усиление спонтанной секреции при удалении большого количества холестерина из мембран. Показано, что повышение частоты спонтанной секреции при действии МЦД не зависит от вне- и внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} . Умеренная экстракция холестерина из плазматических мембран угнетает вызванную секрецию, увеличивает синаптическую задержку, уменьшает выраженность облегчения и депрессии секреции медиатора при высокочастотном раздражении. Резкое уменьшение пула мембранного холестерина блокирует проведение ПД по нерву, тем самым полностью подавляя вызванную секрецию.

В работе получены приоритетные данные о влиянии ферментативного окисления холестерина на секрецию нейромедиатора из НО. Оказалось, что в отличие от удаления холестерина из мембран, его окисление не имеет выраженных эффектов на частоту спонтанной секреции, но увеличивает время спада миниатюрных токов концевой пластинки (МТКП), и по аналогии с МЦД угнетает вызванное освобождение медиатора.

Научно-практическая ценность

Данная работа носит фундаментальный характер. Полученные результаты являются хорошим дополнением для лучшего понимания функционирования таких витальных процессов, как спонтанная и вызванная секреции, экзоцитоз и транспорт СВ, внутриклеточная сигнализация, электрогенез в нервных волокнах. Результаты работы могут быть полезны для объяснения явлений, происходящих в нейронах центральной нервной системы и клетках, активно использующих процессы экзо – и эндоцитоза. Полученные данные позволяют считать, что холестерин плазматической мембраны выступает как организатор спонтанной и вызванной секреции в нервно-мышечном синапсе. Исследование может помочь разобраться в механизмах, лежащих в основе патологических состояний, связанных с нарушением кругооборота холестерина. Работа поддержана грантами Министерства образования и науки Российской Федерации (НШ-5250.2010.4 и МК-3840.2010.4), Российского фонда фундаментальных исследований (№ 11-04-00422-а, №09-04-97015-р).

Личный вклад диссертанта

Приведенные в работе данные получены при личном участии соискателя на всех этапах работы, включая составление плана исследования, проведение экспериментов, обработку полученных данных, и оформление публикаций.

Апробация работы

Результаты исследований, выполненные по теме диссертации, доложены на конференциях и форумах: III международном молодежном медицинском конгрессе “Санкт-Петербургские научные чтения-2009” (Санкт-Петербург, 2009); на XXI съезде Физиологического общества им. И.П.Павлова (г. Калуга, 2010); международном симпозиуме «Biological Motility: from Fundamental Achievements to Nanotechnologies» (Пушино, 2010); XV международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2011); международном молодежном научном форуме «Ломоносов», (Москва, 2010, 2011); международной конференции “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация” (Пушино, 2011); VII международном

междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Крым, Украина, 2011); всероссийских конференциях с международным участием "Молодые ученые в медицине" (Казань, 2010, 2011); на заседании кафедры нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета (2011).

Реализация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 2 публикации в рецензируемых журналах (из списка ВАК). Материалы диссертации неоднократно доложены на ежегодных научных конференциях в Казанском государственном медицинском университете. Полученные данные используются при чтении лекций на кафедре нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация объемом 132 страницы состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список цитируемой литературы включает 256 источника, из них 11 отечественных и 245 - иностранных. Диссертация содержит 25 рисунков.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились на изолированных нервно-мышечных препаратах кожно-грудинной мышцы лягушки (*Rana ridibunda*) и диафрагмальной мышцы белых мышей. После выделения нервно-мышечный препарат помещали в ванночку объемом 7 мл. Все эксперименты выполнены при постоянной наружной перфузии препарата раствором Рингера для холоднокровных следующего состава (мМоль/л): NaCl — 115,0, KCl — 2,5, CaCl₂ — 1,8, NaHCO₃ — 2,4. Для теплокровных животных использовали раствор Кребса (мМоль/л): NaCl — 144,0; KCl — 5,0; MgCl₂ — 1,0; CaCl₂ — 2,0; NaH₂PO₄ — 1,0; NaHCO₃ — 2,4; C₆H₁₂O₆ — 11,0. В экспериментах с высокой концентрацией Ca²⁺ (1,8 ммоль/л) блокирование мышечных сокращений достигалось за счет добавления d-тубокурарина (3-5 мкмоль/л). В условиях низкого Ca²⁺ использовались модифицированные растворы Рингера и Кребса с концентрацией Ca²⁺ (0,3-0,5 мМоль/л) и Mg (4,0 мМоль/л). Все эксперименты проведены при температуре 20°C, pH поддерживался на постоянном уровне 7,2-7,4. Раздражение двигательного нерва осуществляли прямоугольными электрическими импульсами сверхпороговой силы с частотой 0,5 – 50 имп/с.

В экспериментах применяли следующие фармакологические препараты: МЦД (метил- β -циклодекстрин)- водорастворимый олигосахарид, образующий полость, в которую захватывается холестерин из мембран (Yancey P.G., et al., 1996), в концентрации 0,1; 1; 5; 10 мМ; холестеролоксидаза (ХО) (из бактерий рода *Streptomyces* sp, 1 активная единица) - окисляющая холестерин до образования холест -4- ен-3- она; ионы Cd^{2+} 1мМ; ВАРТА-АМ (1,2-bis(2-Aminophenoxy)ethane – N,N,N',N'-tetraacetic acid acetoxymethyl ester) – «быстрый» мембранопроникающий кальциевый буфер; филипин – флуоресцентный атнибиотик, специфически связывающийся с холестерином; для фиксации препаратов - формалин (3%). Все использованные вещества фирмы «SIGMA» (США).

Регистрация синаптических сигналов. Метод внеклеточного отведения использовался в экспериментах с пониженной внеклеточной концентрацией ионов Ca^{2+} и увеличенной концентрацией ионов Mg^{2+} (Зефилов А.Л. и др., 1990). Для внеклеточной регистрации использовали стеклянные микроэлектроды, заполненные раствором NaCl (2ммоль/л), с диаметром кончика около 1-2 мкм и сопротивлением 1-5 МОм. Электрод прижимали к поверхностно лежащему НО и регистрировали спонтанные, миниатюрные токи концевой пластинки (МТКП) и вызванные раздражением двигательного нерва ответы нервного окончания и токи концевой пластинки (ТКП). Частоту МТКП определяли по среднему интервалу времени между соседними МТКП (в с^{-1}). Квантовый состав ТКП рассчитывали используя метод выпадений, по формуле $m = \ln(N/N_0)$, где N - общее количество раздражений, а N_0 - количество раздражений, не вызвавших появления ТКП. Синаптическую задержку определяли как интервал времени между пиком пресинаптического ПД и началом одноквантового ТКП. Для анализа использовали 250-600 ТКП или МТКП.

Метод внутриклеточной регистрации использовали при высоких внеклеточных концентрации ионов Ca^{2+} . Использовали стеклянные микроэлектроды с диаметром кончика менее 1 мкм и сопротивлением 2-10 МОм, заполненные 3М раствором KCl. Введение микроэлектрода в мышечное волокно осуществляли в области НО под визуальным контролем. Этот вид отведения использовался для анализа вызванных, многоквантовых потенциалов концевой пластинки (ПКП) возникающих в ответ на длительное высокочастотное раздражение двигательного нерва. После регистрации ПКП рассчитывали квантовый состав (m) каждого ПКП при определении квантового размера (q) через дисперсию амплитуды ПКП. (Elmqvist D. et al., 1965; Hubbard J.I., et al., 1973; Зефилов А.Л., и др., 2008). В основе метода лежат предположения о неизменности количества медиатора в везикуле, неизменности чувствительности постсинаптической мембраны к медиатору в процессе ритмического раздражения и пропорциональности

амплитуды ПКП количеству освободившихся квантов. В массиве значений амплитуд ПКП, полученном при длительном ритмическом раздражении, выбирали участок, в котором рассчитывали квантовую величину по формуле: $q = \frac{\sigma^2}{\langle V \rangle}$,

где σ^2 – дисперсия амплитуды ПКП на выбранном участке, $\langle V \rangle$ – средняя амплитуда ПКП.

Флуоресцентная микроскопия. Для качественной оценки изменения концентрации холестерина в мембранах мы использовали флуоресцентный антибиотик филиппин, который избирательно связывается с холестерином мембраны, и его флуоресценция служит индикатором концентрации холестерина (Kruth H.S., et al., 1980). МЦД – обработанные и контрольные препараты были первоначально зафиксированы в растворе 3% формалина в течение 1 часа, с последующей аппликацией филиппина (1 час). Свечение препаратов наблюдали с помощью флуоресцентного микроскопа, используя ультрафиолетовый фильтр (430нм). Флуоресценцию наблюдали с помощью микроскопа МИКМЕД-2 (“ЛОМО”, Санкт-Петербург) или Olympus BX-51WI. В экспериментах для анализа экзоцитоза СВ, использовали флуоресцентный краситель - FM 1-43 (“Biotium” США) в концентрации 2-4 мкмоль/л. Краситель обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза оказывается внутри вновь образующихся синаптических везикул (“загружается” в НО). При загрузке красителя в НО появляются светящиеся пятна, отражающие скопления меченых FM 1-43 везикул в области АЗ, прошедших цикл экзо-эндоцитоза (Betz W. J. et al., 1992; Betz W. J. et al., 1993; Зефилов А. Л. и др., 2003). С целью уменьшения неспецифического свечения за счёт связывания красителя с поверхностными мембранами использовали ADVASEP-7 в концентрации 1мкм/л (Biotium, США). Загрузку красителя в НО осуществляли при частоте раздражения 20 имп/с. После этого препарат отмывался в течение 40 мин в стандартном растворе при температуре 5° С.

Чтобы выяснить динамику экзоцитоза синаптические везикулы предварительно метили красителем (загружали краситель в НО). Для этого двигательный нерв нервно-мышечного препарата раздражали в течение трёх минут. FM1-43 присутствовал в растворе как во время стимуляции так и в течение 5 – 15 минут после её окончания. Такой протокол позволяет загрузить красителем практически все везикулы, участвующие в секреции медиатора (Richards D. A. et al., 2000). Для анализа процессов экзоцитоза и рециклирования СВ осуществляли выгрузку красителя. Для этого нервно-мышечный препарат стимулировали с частотой 20 имп/с в течение 10 минут, анализируя снижение интенсивности флуоресценции.

Флуоресценцию наблюдали с помощью микроскопа МИКМЕД-2 (“ЛОМО”, Санкт-Петербург) или Olympus BX-51WI. Все наблюдения проводили только на поверхностно лежащих НО. Для фиксирования картин флуоресценции использовали чёрно-белую видеокамеру (WAT-902H, “Watec co., LTD”, Япония), совмещенную с персональным компьютером. Интенсивность свечения оценивали в относительных единицах (о.е.), принимая максимальное свечение пикселя за единицу. Фоновое свечение оценивали при аппликации красителя в омывающий клетку раствор на одну минуту в отсутствии стимуляции. Фоновое значение впоследствии вычитали из каждого пикселя полученного после изображений.

Флуоресцентно-микроскопические эксперименты выполнены совместно с А.М. Петровым (ст. преподавателем каф. норм. физиологии КГМУ, к.б.н.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения концентрации холестерина в мембранах нервно-мышечных препаратов лягушки и мышцы, обработанных МЦД.

Для оценки вымывания холестерина из мембран мы использовали флуоресцентный антибиотик филиппин (см. методику), флуоресценция которого служит индикатором концентрации холестерина. В экспериментах с филиппином в препаратах лягушек и мышей окрашивались как главная ветвь аксона, так и мышечные волокна, что говорит о присутствии холестерина в мембранах обеих структур. В связи невозможностью оценить свечению нервного волокна в препаратах мышцы, анализировали интенсивность свечения мышечных волокон.

Свечение мышечных волокон препарата лягушки обработанных МЦД 1мМ составило (74,6+ 5,1 о.е.), 5 и 10 мМ (примерно 60 – 45 о.е.) по сравнению с контролем (91,7+ 7,7 о.е.). Свечение мышечных волокон препарата мышцы обработанных МЦД 1мМ составило (125,4+13,2), 5мМ (111,5+0,3) и 10мМ (19,2+2,6), по сравнению с контролем (132,3+8,3 о.е.). Фактически для нервно-мышечных препаратов мышцы, обработанных 10мМ МЦД характерно отсутствие контура ветви аксона.

Из данных следует, что холестерин присутствует как в мембране мышечных волокон, так и в мембранах нервных волокон обоих препаратов.

Влияние метил-β-циклодекстрина на спонтанную секрецию медиатора из двигательных НО.

В контроле частота МТКП в синапсах лягушки и мыши составляла $0,33 \pm 0,04 \text{ с}^{-1}$ ($n=10$) и $1,15 \pm 0,21 \text{ с}^{-1}$ ($n=10$). Время нарастания и полуспада МТКП составляли $0,25 \pm 0,01$ и $1,00 \pm 0,05$ мс у лягушки и $0,27 \pm 0,01$ и $0,98 \pm 0,04$ мс, у мыши. Получасовая аппликация МЦД в концентрации 0,1-1,0 мМ не изменяла частотных и амплитудно-временных параметров МТКП. Более высокая концентрация (10 мМ) приводила к значительному увеличению частоты МТКП ($p < 0.01$), которая у лягушки составила $2,16 \pm 0,37 \text{ с}^{-1}$ ($n=5$), а у мыши $3,21 \pm 0,38 \text{ с}^{-1}$ ($n=5$), (рис. 1). В таких концентрациях МЦД не влиял на амплитуду МТКП, но незначительно увеличивал время полуспада МТКП, у лягушки до $1,47 \pm 0,33$ мс, а у мыши до 6 %.

Представленные данные, свидетельствуют о том, что существенное вымывание холестерина из мембран оказывает пресинаптический эффект, приводя к усилению спонтанной секреции медиатора. Механизм усиления спонтанной секреции медиатора при значительном снижении содержания холестерина в мембранах остается неизвестным.

Эффекты метил-β-циклодекстрина на частоту МТКП при уменьшении входа ионов Ca^{2+} в НО.

Повышение частоты спонтанной секреции медиатора при высоких концентрациях МЦД может быть связано с увеличением внутриклеточной концентрации ионов Са при удалении из мембраны значительного количества холестерина. Для выяснения роли внутриклеточных ионов Ca^{2+} на частоту МТКП, мы провели эксперименты с использованием блокатора Ca^{2+} -каналов - ионов Cd^{2+} (1 мМ) или в бескальциевых растворах. При этих воздействиях нарушается поступление ионов Ca^{2+} в НО из внеклеточной среды. Добавление МЦД (10мМ) в растворах с ионами Cd^{2+} или в бескальциевых растворах как в синапсах лягушки, так и мыши приводило к существенному увеличению частоты МТКП, которое не отличалось от увеличения в растворах с ионами Ca^{2+} ($4,0 \pm 0,7 \text{ с}^{-1}$, а у мыши до $2,6 \pm 0,9 \text{ с}^{-1}$). Таким образом, можно считать, что усиление спонтанной секреции медиатора при действии высоких концентраций МЦД имеет кальций-независимый характер.

Возможно, что истощение холестерина может увеличивать вероятность спонтанного слияния везикул путем простого изменения биофизических свойств мембраны.

Эффекты ХО на спонтанную секрецию медиатора.

Для дальнейшего определения эффектов возникающих при изменении уровня холестерина в мембране, мы ферментативно «удаляли» холестерин мембраны, применяя холестеролоксидазу. Холестерин под действием ХО окисляется до образования кетона (холестенон-3), который разрушает липидные функциональные микродомены (Xu J., et al., 2000; Samsonov M., et al., 2001). Оказалось, что окисление холестерина, также как в случае с МЦД не изменяет амплитуду и время нарастания, но несколько увеличивает время полуспада МТКП, для лягушки до $1,33 \pm 0,088$ мс, а для мыши до $1,11 \pm 0,05$ мс. На фоне действия ХО, частота МТКП составила $0,28 \pm 0,12$ с⁻¹ (n=10) для лягушки и $0,88 \pm 0,19$ с⁻¹ (n=10) для мыши.

Таким образом, интенсивность спонтанной секреции зависит от наличия холестерина в мембранах, а не от его функционального состояния. Возможно, холестерин мембраны в естественных условиях «сдерживает» уровень спонтанной секреции в пределах нормы, предотвращая излишнюю трату медиатора.

Действие МЦД и ХО на электрогенез двигательного нервного окончания.

В условиях раздражения двигательного нерва МЦД в концентрациях 0,1 и 1,0 мМ не оказывал каких-либо эффектов на амплитуду и форму электрического ответа нервного окончания (отражающего ионные токи при распространении пресинаптического ПД) (n=6). Однако при концентрации 5 мМ происходило некоторое уменьшение амплитуды и расширение ответа НО, а при 10 мМ ответ нервного окончания резко уменьшался (n=10) и примерно в 2/3 экспериментов исчезал (рис. 1). Это свидетельствует о том, что значительное уменьшение холестерина в мембране аксона и НО приводит к нарушению генерации и распространения ПД. Причины снижения возбудимости не известны и требуют дальнейших исследований. Можно предполагать, что истощение холестерина изменяет функцию Na- и K- каналов и/или снижает активность Na-K насоса (Cornelius F., 2001).

Окисление мембранного холестерина ХО не влияло на амплитудно-временные параметры ответа НО как у лягушки, так и у мыши.

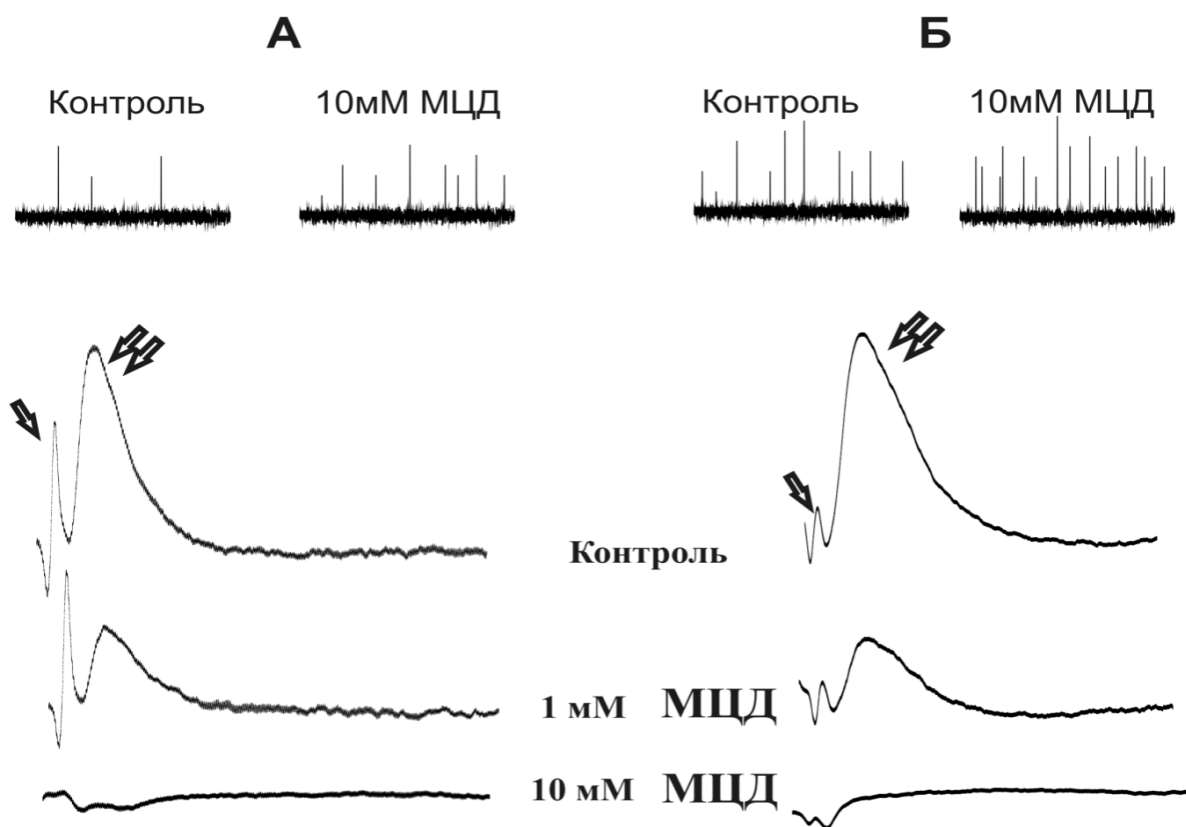


Рис. 1. Влияние МЦД на спонтанную и вызванную секрецию медиатора из двигательных НО лягушки (а) и мыши (б).

На верхней панели изображено изменение частоты МТКП при действии 10 мМ МЦД. На нижней панели представлены усредненные (50 реализаций) ответы при раздражении двигательного нерва (пресинаптический ПД указан одной стрелкой, а ТКП – двойной) в контроле и на фоне действия 1 и 10 мМ МЦД.

Влияние метил-β-циклодекстрина и холестеролоксидазы на квантовый состав ТКП.

Вслед за ответом нервного окончания (пресинаптическим ПД) регистрируются преимущественно одноквантовые ТКП, отражающие вызванное освобождение квантов медиатора. Средний квантовый состав ТКП в синапсах лягушки составлял $0,52 \pm 0,07$ ($n=10$), а в синапсах мыши - $0,96 \pm 0,16$ ($n=10$). Поскольку высокие концентрации МЦД (5-10 мМ) приводят к нарушению электрогенеза НО дальнейшие эксперименты проводились при концентрации 1 мМ. Обнаружено, что при концентрации 1 мМ происходило достоверное ($p < 0.05$) снижение квантового состава ТКП до $0,33 \pm 0,071$ ($n=5$) и $0,21 \pm 0,11$ ($n=5$) в синапсах лягушки и мыши, соответственно (рис. 1). Снижение секреции медиатора при вымывании холестерина из мембран сопровождалось небольшим (10-20%)

увеличением среднего значения синаптических задержек $1983,8 \pm 279$ для лягушки и $1127,3 \pm 114,4$ для мыши, по сравнению с контролем $1107,6 \pm 129$ и $952,9 \pm 70,4$, соответственно; ростом дисперсии их распределения, как в синапсах лягушки, так и в синапсах мыши. Возможно, что при низких концентрациях МЦД происходит снижение активности и/или колокализации белков экзоцитоза и Са-каналов, в результате снижается вызванная секреция медиатора. Причиной увеличения синаптической задержки и асинхронности секреции медиатора может также быть дезорганизация активных зон и смещение Са-каналов от СВ и сайта экзоцитоза.

При ферментативном окислении холестерина также происходит снижение квантового состава ТКП, однако менее выраженное, чем после вымывания холестерина из мембран на фоне действия МЦД. Под влиянием ХО происходило достоверное ($p < 0.05$) снижение квантового состава ТКП до $0,41 \pm 0,12$ ($n=5$) и $0,81 \pm 0,13$ ($n=5$) в синапсах лягушки и мыши, соответственно.

Можно думать, что для эффективного осуществления вызванной секреции медиатора важно не только количество присутствующего холестерина в мембране, но и его качественное состояние. Вероятно, в обоих случаях, выход из игры холестерина вызывает дисперсию «липидных плотиков», что в свою очередь приводит к изменению колокализации Са-каналов и белков экзоцитозной машины.

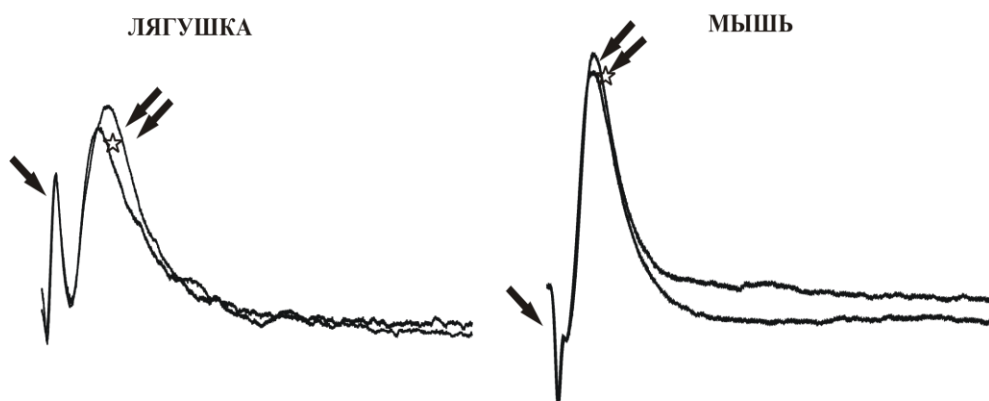


Рис 2. Эффект ХО на секрецию медиатора из НО лягушки и мыши.

Наложенные друг на друга усредненные (50 реализаций) ответы при раздражении двигательного нерва (пресинаптический ПД указан одной стрелкой, а ТКП – двойной) в контроле и на фоне действия холестеролоксидазы (звездочка).

Выраженность облегчения секреции медиатора при высокочастотном ритмическом раздражении на фоне действия МЦД.

В контроле при низкой внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} (0,3мМоль/л) высокочастотное ритмическое раздражение (10 или 50имп/с) сопровождалось развитием облегчения, которое выражалось в постепенном увеличении средней амплитуды и квантового состава ТКП. При раздражении с частотой 10 имп/с амплитуда ТКП для нервно-мышечного препарата лягушки к 30-й секунде возрастала до $127,2 \pm 26,3$ %. а для мыши до $112,65 \pm 12,1$ %. При выдержке препаратов в МЦД 1мМоль наблюдалось менее выраженное развитие облегчения для лягушки: амплитуда ТКП к 30-й секунде возрастала до $118,0 \pm 10,4$ %, а для препарата мыши амплитуда к 30-ой секунде возрастала всего лишь на $102,08 \pm 19,1$ %.

При стимуляции с частотой 50 имп/с амплитуда ТКП в контроле для нервно-мышечного препарата лягушки к 30-й секунде возрастала до $134,7 \pm 20$ %, а у мыши до $137,7 \pm 31$ %. При получасовой экспозиции в МЦД 1 мМ для лягушки наблюдалось облегчение, которое было больше контрольного значения на 20% (амплитуда к 30-ой секунде составила $151,7 \pm 24,3$ %), для мыши облегчение было не столь существенным $108,6 \pm 17,6$ %.

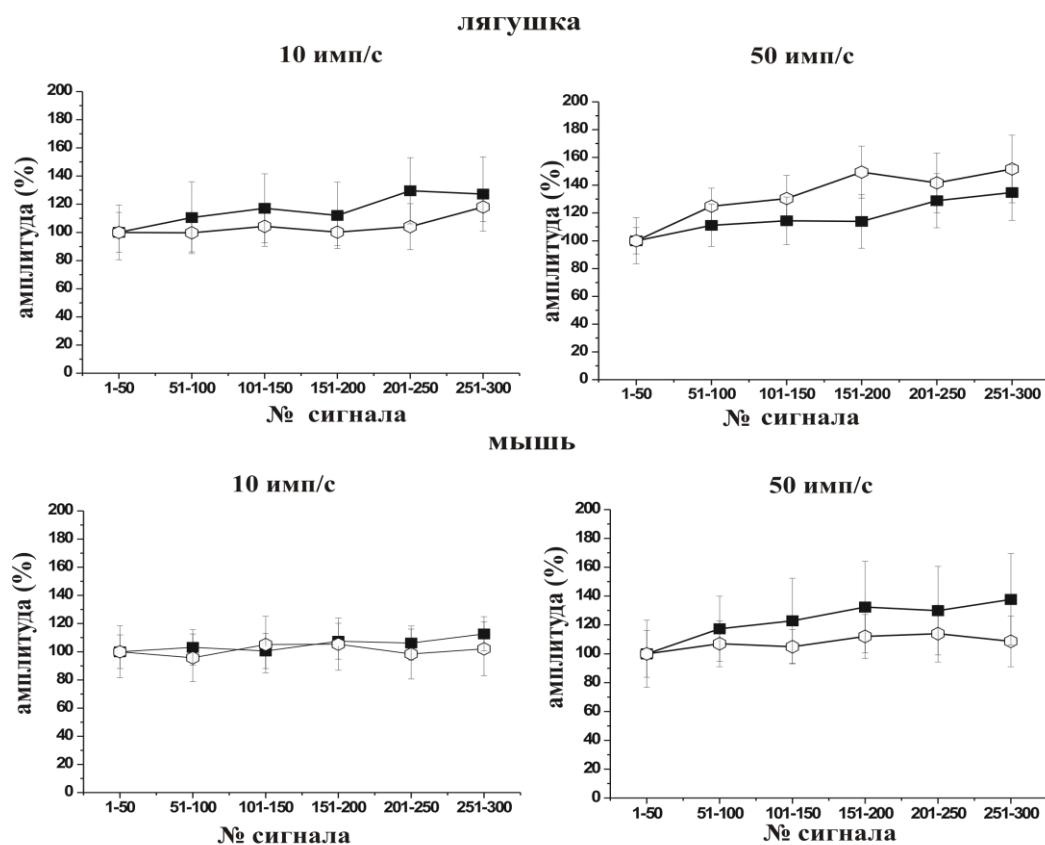


Рис.3 Динамика секреции медиатора в контроле и на фоне действия МЦД

На графике изображена динамика амплитуды ТКП в процессе высокочастотного раздражения с частотой 10 имп/с в контроле (черные квадраты), а также после 30 минутной экспозиции в МЦД 1мМоль (белые кружки).

Влияние МЦД на депрессию секреции медиатора при длительном высокочастотном раздражении.

Опыты проводили на нервно-мышечных препаратах лягушки. В данных экспериментах использовали серию длительного (300 стимулов) высокочастотного (10 или 20 имп/с) раздражения. В контрольных экспериментах длительное высокочастотное раздражение двигательного нерва сопровождалось характерными изменениями. Вслед за коротким периодом облегчения наблюдалось быстрое уменьшение амплитуды и квантового состава ТКП, которое сменялось более медленным спадом. Квантовый состав первого ПКП в серии составил 1145 - 230. К 300 раздражению с частотой 10 имп/с квантовый состав ТКП был 2,2 - 0,2 раза меньше квантового состава первого ТКП (рис.). Выдерживание препарата в растворе с МЦД (1 мМ) приводило к снижению квантового состава ТКП первого ТКП до 907 - 85, а выраженность депрессии возрастала (квантовый

состав 300 ТКП бы в 3,4 - 0,4 раза меньше первого). Аналогичная ситуация наблюдалась при частоте раздражения 20имп/с.

Полученные данные позволяют считать, что вымывание холестерина наряду со снижением квантового состава ПКП усиливает выраженность депрессии секреции медиатора при высокочастотном раздражении.

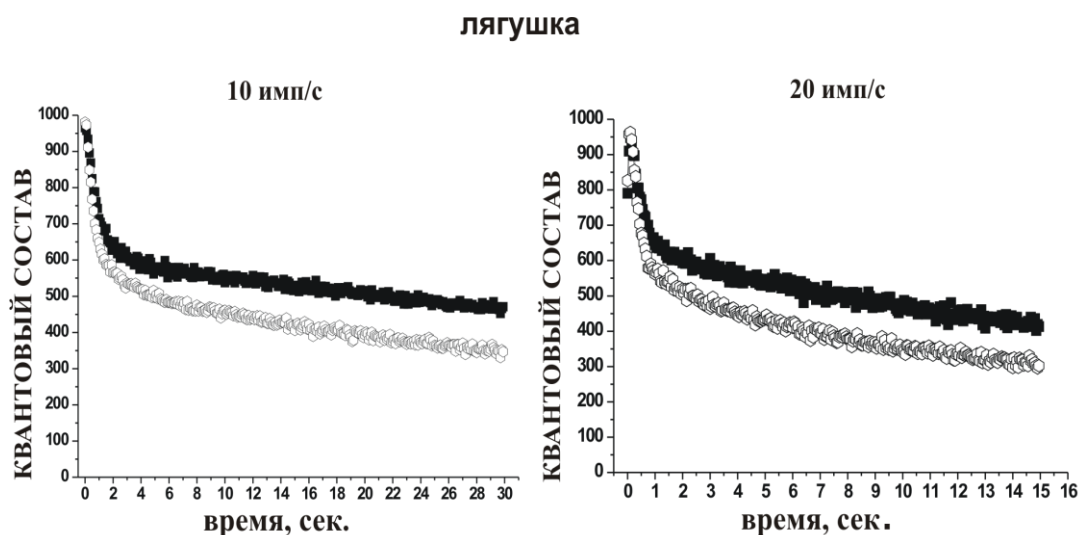


Рис.3 Влияние МЦД на депрессию секреции медиатора при длительном высокочастотном раздражении.

Выдерживание препарата в растворе с МЦД (1 мМ) и стимуляция частотой 10 имп/с приводила к снижению квантового состава ТКП, а выраженность депрессии возрастала. Аналогичная ситуация наблюдалась при частоте раздражения 20имп/с.

Эффект МЦД на экзоцитоз СВ при длительном высокочастотном раздражении.

Выгрузку красителя из НО, предварительно загруженных красителем (3 мин., 20 имп/с), производили длительной высокочастотной стимуляцией двигательного нерва (20 имп/с). Снижение интенсивности флуоресценции происходило в две фазы — сначала быстро, а затем медленнее. Для препаратов лягушки через 1,5 мин. стимуляции интенсивность свечения в контроле падала до $53 \pm 1,6$ % ($n = 7$). Обработка нервно-мышечного препарата МЦД 1мМ заметно замедляла выгрузку красителя из двигательных НО, особенно вначале высокочастотной стимуляции. Поэтому через 1,5 мин. стимуляции яркость свечения снижалась только до $65 \pm 1,5$ % . К 5-ой минуте раздражения яркость НО в контроле падала до $32,8 \pm 1,8$ %, а в эксперименте только до $51 \pm 1,2$ %.

В нервно-мышечном синапсе мышцы интенсивность свечения в контроле через 1,5 мин. стимуляции падала до $63,6 \pm 6,2$ %, а через 5,7 минуты до $29,7 \pm 7,0$ % ($n=5$). Предварительная обработка НО мышцы МЦД 1 мМ, также как в случае с НО лягушки

приводила к замедлению выгрузки красителя. Через 1,5 минуты стимуляции яркость флуоресценции НО падала до $72,7 \pm 13,6$ %, а спустя 5,7 мин $52,3 \pm 14,8$ %.

Замедленная выгрузка красителя после высокочастотной стимуляции, скорее всего, результат нарушения доставки везикул резервного пула в сайты экзоцитоза, вызванное удалением холестерина из мембраны.

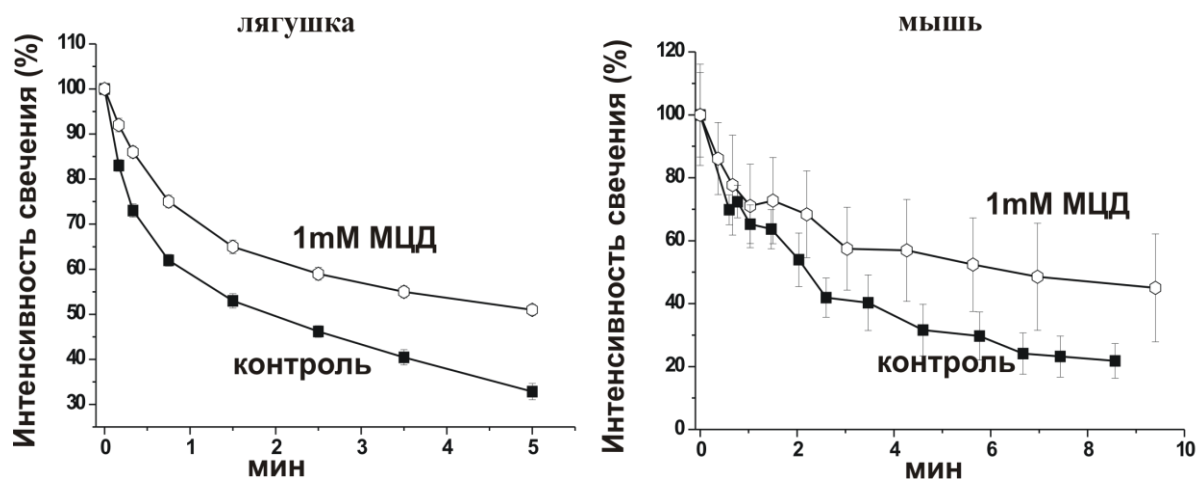


Рис.4 График выгрузки красителя FM1-43 из двигательных НО лягушки и мыши высокочастотным раздражением в контроле и на фоне действия МЦД 1мМоль.

Обработка нервно-мышечного препарата МЦД 1мМ заметно замедляла выгрузку красителя из двигательных НО, как у лягушки, так и у мыши.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что холестерин плазматической мембраны нервно-мышечного соединения принимает непосредственное участие в секреции и экзоцитозе синаптических везикул. Эффекты, реализуемые холестерином плазматической мембраны аналогичны, как в нервно-мышечном синапсе лягушки, так и для нервно-мышечного синапса мыши.

ВЫВОДЫ

1. МЦД эффективно вымывает холестерин из плазматических мембран. Изменения концентрации холестерина в мембранах нервно-мышечных препаратов лягушки и мыши, обработанных МЦД.
2. Экстракция холестерина из мембран двигательных нервных окончаний лягушки и мыши низкими концентрациями МЦД (0,1;1мкмоль) не вызывает изменений частоты и амплитудно-временных параметров МТКП, тогда как высокие концентрации МЦД (5;10ммоль) приводят к увеличению частоты МТКП и незначительному увеличению времени их полуспада. Окисление холестерина не влияет на частоту спонтанной секреции МТКП, но увеличивает время полуспада МТКП.
3. Усиливающий эффект на частоту МТКП высоких концентрации МЦД (10ммоль) кальция независим.
4. Значительное вымывание холестерина из мембран (10 мМ МЦД) приводит к нарушению генерации и проведения ПД в НО лягушки и мыши..
5. На фоне действия 1 мМ МЦД происходит снижение квантового состава ТКП с увеличением асинхронности секреции медиатора как в нервно-мышечных препаратах лягушек, так и мышей.
6. Окисление холестерина вызывает небольшое уменьшение квантового состава ПКП, без влияния на время синаптической задержки.
7. При высокочастотной стимуляции двигательного нерва в условиях низкой внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} удалении холестерина из мембраны (1 мМоль МЦД) наблюдается менее выраженное облегчение секреции медиатора.

8. При блокировании Са-каналов ионами Cd или бескальциевых растворов и одновременной аппликации высокой дозы МЦД не влияло на частоту МТКП в нервно- мышечных соединениях лягушки и мыши.
9. Удалении холестерина из поверхностных мембран (1 мМоль МЦД) при высоких внеклеточных концентрациях ионов Ca^{2+} ведет к усилению депрессии секреции медиатора при высокочастотном раздражении.
10. Экстракция холестерина из мембраны нервного окончания (1 мМоль МЦД) приводит к угнетению процессов экзоцитоза синаптических везикул и нарушению транспорта везикул к местам экзоцитоза.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Тараканова О.И. Роль холестерина в процессах экзо-и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании лягушки/ А. М. Петров, М. Р. Касимов, А. Р. Гиниатуллин, О. И. Тараканова, А.Л.Зефиров //Российский Физиологический Журнал им. И.М. Сеченова т.95,№ 7,2009, С.762-772
2. Тараканова О.И. Роль мембранного холестерина в процессах секреции медиатора из двигательных нервных окончаний/О.И. Тараканова, А.М. Петров, А.Л.Зефиров //Доклады Академии Наук, т.438, №2, 2011, С. 279–281
3. Тараканова О.И. Механизм сопряжения квантовой и неквантовой секреции медиатора в двигательном нервном окончании диафрагмы крысы/ О.И. Тараканова, А.Л.Зефиров, А.М. Петров, Н.В. Наumenко, А.Р. Гиниатуллин, Ю.Г. Одношивкина// Экспериментальная и прикладная физиология, т.16, 2011, С.175-187
4. Тараканова О.И. Холестерин в секреции медиатора из диафрагмальной мышцы мыши/ Тараканова О.И. А.М. Петров, А.Л.Зефиров // XXI съезд Физиологического общества им. И.П.Павлова, Калуга,2010, С. 594
5. Тараканова О.И. Холестерин в экзоцитозе синаптических везикул/ Тараканова О.И. А.М. Петров, А.Р. Гиниатуллин, Р.Д. Мухамедзянов, А.Л.Зефиров // XXI съезд Физиологического общества им. И.П.Павлова, Калуга, 2010, С. 595
6. Тараканова О.И. Эффект экстракции холестерина из мембраны двигательного нервного окончания с помощью метил-β-циклодекстрина/ Тараканова О.И.//Международный молодежный научный форум «Ломоносов-2010», Москва,2010, С.36

7. Tarakanova O.I. Removing of cholesterol from of the motor nerve ending membrane of frog changes the neurotransmitter secretion/ Tarakanova O.I./International Symposium «Biological Motility: from Fundamental achievements to Nanotechnologies» Pushchino,2010, P.412
8. Тараканова О.И. Холестерин плазматической мембраны в процессах передачи нервных импульсов у позвоночных животных/ О.И. Тараканова, А.Л.Зефилов//Санкт-Петербургские научные чтения, III Международный молодежный медицинский конгресс, Санкт-Петербург,2009, С.310-311
9. Тараканова О.И. Участие холестерина мембраны в спонтанной секреции медиатора из двигательных нервных окончаний лягушки и мыши/ Тараканова О.И., А.Л.Зефилов//XVI Всероссийский научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине», Казань,2011, С.135
10. Тараканова О.И. Холестерин плазматической мембраны в процессах передачи нервных импульсов у позвоночных животных/ Тараканова О.И., А.Л.Зефилов//XVI Всероссийский научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине», Казань,2010, С.296
11. Тараканова О.И. Эффект холестеролоксидазы на секрецию медиатора из двигательных нервных окончаний лягушки/ Тараканова О.И., А.Л.Зефилов// Международный молодежный научный форум «Ломоносов-2011», Москва,2011, С. 32
12. Тараканова О.И. Эффект холестеролоксидазы на секрецию медиатора из двигательных нервных окончаний лягушки и мыши/ Тараканова О.И., А.Л.Зефилов// XV Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология-наука XXI века», Пущино, 2011, С.154
13. Тараканова О.И. Эффекты холестеролоксидазы на рециклирование синаптических везикул/ Тараканова О.И., Касимов М.Р., Кудряшова К.Е., Одношивкина Ю.Г., Петров А.М.//Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Пущино,2011, С.114
14. Тараканова О.И. Влияние холестеролоксидазы на секрецию медиатора из двигательных нервных окончаний лягушки и мыши/ Тараканова О.И., А.Л.Зефилов//VII Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии», Украина, Судак, 2011, С.410